

UNIVERSITE DE GENEVE
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

FACULTE DES SCIENCES
PROFESSEUR ERIC STEIN

" ROLE DU ZINC DANS L'AMINOPEPTIDASE DE REIN "

T H E S E

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

P a v e l LEHKY

de Brno

(Tchécoslovaquie)

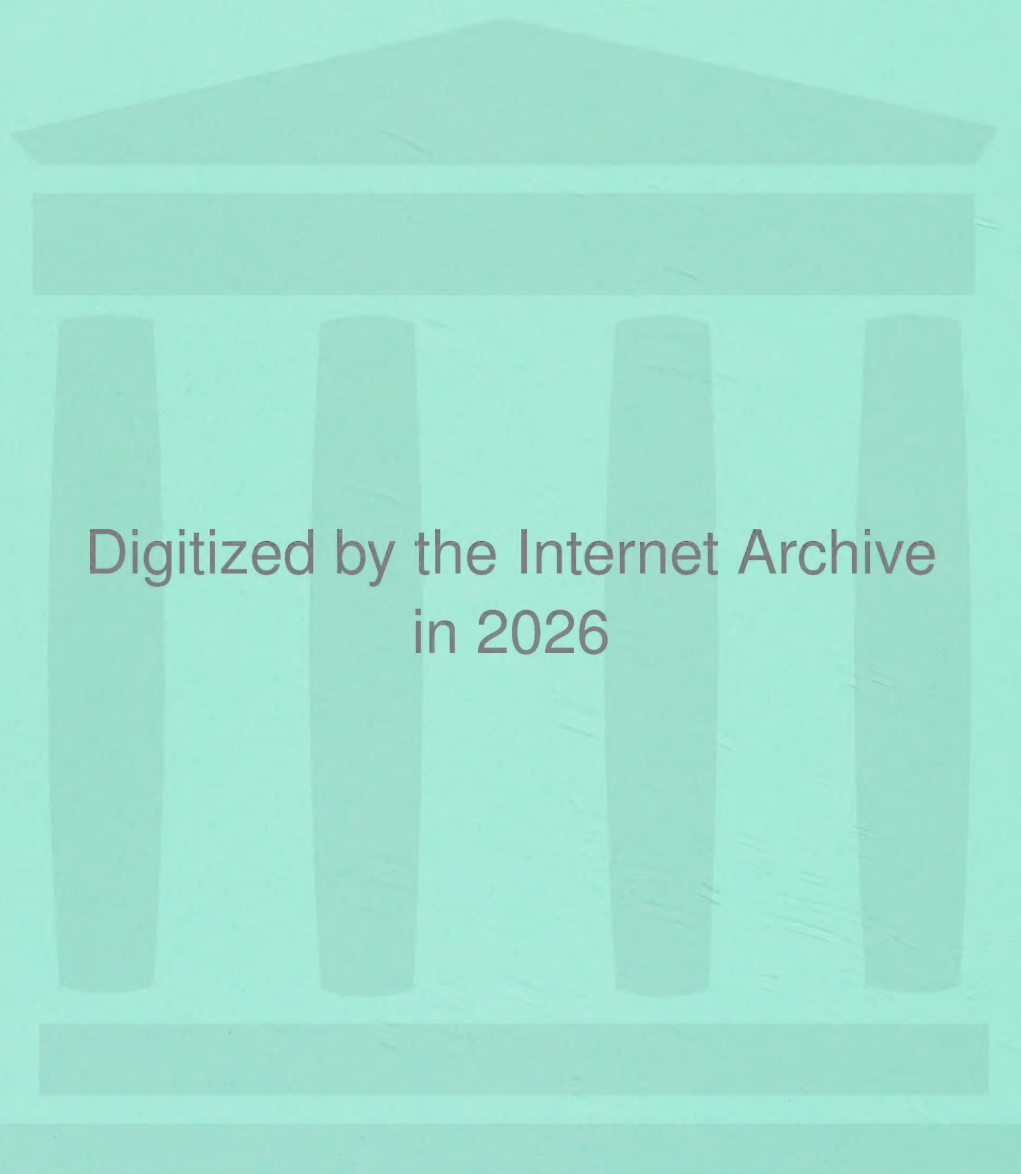
Thèse N° 1615

Texte condensé de la thèse N° 1615 approuvé par la Faculté des Sciences. Des copies en microfilm du text complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le text complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

GENEVE

Imprimerie de l'Ecole de physique

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0040

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

PROFESSEUR ERIC STEIN

" ROLE DU ZINC DANS L'AMINOPEPTIDASE DE REIN "

T H E S E

présentée à la Faculté des Sciences

de l'Université de Genève

pour obtenir le grade de docteur ès sciences chimiques

par

P a v e l L E H K Y

de Brno

(Tchécoslovaquie)

Thèse N° 1615

Texte condensé de la thèse N° 1615 approuvé par la Faculté des Sciences. Des copies en microfilm du text complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève. Le text complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

GENEVE

Imprimerie de l'Ecole de physique

1973

La Faculté des sciences, sur le préavis du professeur E.A.Stein, directeur de thèse, du professeur D.S.Feingold (Université de Pittsburgh) et du professeur M.J.Kobr, autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer l'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 20 juin 1973

Le doyen :

Jean Muller

Thèse N° 1615



J'aimerais remercier mon directeur de thèse, le Professeur Eric A. Stein de son intérêt, de ses conseils et de son souci constant d'assurer à ce travail les conditions les plus favorables.

Je remercie également le Professeur D.S. Feingold dont les conseils ont contribué à la rédaction de cette thèse.

Je suis reconnaissant au Dr. Hans Wacker dont les suggestions compétentes m'ont épargné bien des difficultés.

A ma chère femme

I. INTRODUCTION.

Les aminopeptidases sont les enzymes capables de scinder la liaison peptidique entre le dernier et l'avant-dernier acide aminé de l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique. Différentes aminopeptidases ont été trouvées dans les cellules du rein, du foie, du cerveau, dans le sang et même dans le cristallin de l'oeil (1). La fonction physiologique exacte de ces enzymes n'est pas encore clairement établie. L'aminopeptidase particulière qui fait l'objet de cette recherche (E.C. 3.4.1.2) a été isolée du rein de porc (2, 3). Cette peptidase a suscité beaucoup d'intérêt à cause de sa stabilité extraordinaire (4) et parce qu'elle peut scinder n'importe quel acide aminé N-terminal, à l'exception de la proline. Grâce à ces qualités on s'en sert pour l'hydrolyse des protéines et pour en déterminer la séquence.

Les études cinétiques, faites avec différents substrats et inhibiteurs (5, 6), montrent qu'il y a 3 sites différents pour la fixation du substrat. Il semble d'autre part que la tyrosine et l'histidine sont indispensables à l'activité, car leur modification chimique abolit l'activité enzymatique (7). Un mécanisme d'action a même été proposé sur ces bases (6). Cependant les auteurs de cette proposition n'ont pas considéré la participation d'ions métalliques à l'activité catalytique. En effet, l'influence de cations sur l'aminopeptidase particulière de rein a été jusqu'à maintenant insuffisamment étudiée. Les observations publiées à ce sujet sont contradictoires et incomplètes. Il paraît toutefois certain que de nombreux cations inhibent l'aminopeptidase (8) et que le Co^{2+} l'active fortement (9). Mais ces résultats ne répondent pas à la question de savoir si l'enzyme est réellement une métalloenzyme et, le cas échéant, quel serait le rôle du métal.

Dans ce travail nous démontrons que l'aminopeptidase est une métalloenzyme à zinc et étudions en détail l'influence de divers cations sur l'enzyme. Enfin, sur la base de ces résultats, nous proposons une méthode ultrasensible pour le dosage du zinc.

II. METHODES.

1) La préparation de l'aminopeptidase.

L'aminopeptidase particulaire a été isolée selon une modification de la méthode de Pfleiderer (3). La pureté de l'aminopeptidase a été contrôlée par disc-électrophorèse et par ultracentrifugation. L'activité spécifique de l'enzyme pure est de 30 U/mg.

2) Le dosage de l'activité aminopeptidasique.

Pour le dosage de l'aminopeptidase nous utilisons le substrat synthétique L-leu-p-nitroanilide (1,66 mM) dans le tampon TES^{*} (0,05 M) à pH 7,0. On déclenche la réaction en ajoutant l'enzyme au substrat maintenu à 37° C. L'activité enzymatique se traduit par une augmentation de la densité optique à 405 nm mesurée à l'aide d'un photomètre branché sur un enregistreur. Une unité d'activité est égale à la quantité d'enzyme qui libère 1 umole de p-nitroaniline ($E^{405} = 9620$) par minute dans les conditions décrites.

Lors du dosage de l'enzyme appauvrie en zinc, de l'EDTA (concentration finale 10^{-4} M) est ajouté au substrat. Cette adjonction empêche la réactivation accidentelle de l'apoenzyme par des traces de métaux dans le substrat. Lorsqu'on veut réactiver l'apoenzyme, du Zn^{2+} est ajouté au substrat à la place d'EDTA (4).

3) Les différentes méthodes d'élimination du zinc de l'aminopeptidase.

Bien que le zinc soit fortement fixé par l'enzyme, plusieurs méthodes permettent son élimination:

Filtration sur Sephadex G-25. Le passage de l'aminopeptidase à travers une colonne de Sephadex G-25 non tamponné (0,1 M NaCl) permet d'obtenir l'apoenzyme contenant seulement 5% du zinc initial et 2% de l'activité originale. Dans la colonne de Sephadex le pH devient égal au point isoélectrique de l'aminopeptidase, qui est une protéine acide (pH 4 environ). A ce pH, la dissociation du zinc augmente à tel point que le métal n'est

* TES N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sodium sulfonate.

plus retenu par l'enzyme.

Electrodialyse. L'électrodialyse de l'aminopeptidase selon Stein et al (10) réduit la concentration de zinc à un dixième de la valeur originale.

Incubation en présence d'agents complexants. L'incubation de l'aminopeptidase en présence d'EDTA, d'o-phénanthroline ou de Chelex X-100^{*} donne une apoenzyme dont la teneur en zinc n'est plus qu'un centième de celle de l'holoenzyme. L'activité diminue d'autant. La séquestration du zinc par le Chelex est la méthode la plus pratique, car la séparation de l'agent chélatant de l'enzyme se fait par simple centrifugation, tandis que l'EDTA ou l'o-phenanthroline doivent être séparés de l'apoenzyme par filtration sur une colonne de Sephadex G-25 exempt de zinc.

III. RESULTATS ET DISCUSSION.

1) La teneur en métaux de l'aminopeptidase.

La teneur en zinc de l'aminopeptidase pure de 5 préparations différentes était de 2 g atomes de zinc par mole d'enzyme, la variation de la teneur de zinc étant de 10% au maximum. A part le zinc, aucun autre métal n'est détectable par l'absorption atomique (Perkin-Elmer 303) dans l'enzyme pure. Au cours de la purification, la concentration de zinc augmente de 2,5 fois alors que les concentrations des autres cations diminuent progressivement (3).

2) Les propriétés de l'aminopeptidase.

L'apoaminopeptidase est inactive envers les p-nitroanilides d'ala-, leu-, gly- et phe- et les dipeptides leu-gly, gly-leu, ala-leu et gly-gly testés. L'élimination du métal n'affecte ni le poids moléculaire de l'enzyme (volume d'élution de la colonne de Sephadex G-200 inchangé), ni la stabilité apparente dans des conditions normales. Cependant, soumise à des conditions extrêmes (température élevée, milieu acide ou basique, présence d'urée), l'apoenzyme est plus labile que l'enzyme native ou réactivée par du zinc. Il semble que le zinc contribue à stabiliser

* Chelex X-100 contient l'acide iminodiacétique fixé sur la résine Dowex 1.

la molécule, bien qu'il ne soit pas impliqué dans la structure quaternaire de l'enzyme.

3) La relation entre la teneur en zinc et l'activité enzymatique.

La relation entre la teneur en zinc et l'activité enzymatique a été établie au cours de l'élimination du zinc par l'EDTA ou par le Chelex. La figure 1 montre que l'activité diminue proportionnellement avec la teneur en zinc de l'aminopeptidase. La même corrélation est observée lorsque le zinc est progressivement ajouté à l'apoenzyme (figure 2). L'activité augmente proportionnellement à la concentration en zinc jusqu'à 100% pour 2 g atomes de métal par mole d'enzyme. Les adjonctions supplémentaires n'influent plus sur l'activité enzymatique. Cette interdépendance directe montre que les deux atomes de zinc sont équivalents et indispensables à l'activité enzymatique.

4) L'activation de l'apominopeptidase par d'autres cations que le zinc.

Parmi les cations essayés, seuls le Cu^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} sont à même de conférer une activité enzymatique à l'apoenzyme. L'allure de l'activation de l'apoenzyme au cours de la titration par du Cu^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} est présentée sur la figure 2. L'activité est proportionnelle à la concentration du métal jusqu'à environ 2 g atomes de métal par mole d'enzyme. Un excès de ces cations au delà de 2 g atomes/mole n'affecte plus l'activité. Les activités de la Cu-, Co- and Ni-aminopeptidase sont de 240%, 190% et 50% respectivement par rapport à celle de l'enzyme à zinc.

5) L'inhibition de l'aminopeptidase native par des agents chélatants.

Les agents chélatants inhibiteurs peuvent être classés en deux groupes suivant leur effet sur l'activité enzymatique. Le Chelex et l'EDTA provoquent une inactivation lente de l'enzyme. La variation de la concentration d'EDTA entre 10^{-5} et 10^{-3} M est sans effet sur le taux d'inhibition. Dans ce cas l'inactivation de l'aminopeptidase, qui est une réaction du premier ordre, est due à l'élimination du zinc dissocié par l'action chélatante du Chelex ou de l'EDTA. Cette dissociation très lente est l'étape limitante.

Par contre l'inhibition causée par l'o-phénanthroline, le dithiocarbamate, le 8-hydroxyquinoline-sulfonate et le cyanure dépend de leur concentration et elle est instantanée. Ces inhibiteurs, dont l'o-phénanthroline est le mieux étudié, forment un complexe ternaire enzyme-zinc-inhibiteur (E-Zn-I). Ce complexe peut se décomposer rapidement en apoenzyme et complexe binaire séquestrant-Zn. La formation du complexe E-Zn-I, semblable au complexe E-Zn-substrat, est confirmée par le fait que l'o-phénanthroline est un inhibiteur compétitif.

Il est intéressant de noter que l'o-phénanthroline peut fonctionner comme catalyseur de l'élimination du zinc par l'EDTA (ou le Chelex) car il accélère sensiblement la vitesse d'inactivation de l'aminopeptidase par l'EDTA, même lorsqu'il est présent à une concentration 20 fois plus faible que celle de l'enzyme.

6) L'utilisation de l'aminopeptidase pour le dosage ultrasensible du zinc.

Les propriétés de l'aminopeptidase et de l'apoenzyme que nous avons mises en évidence sont très favorables à l'utilisation de cette enzyme pour doser le zinc: forte affinité de l'apoenzyme pour le zinc, activité enzymatique proportionnelle à la teneur en ce métal entre 0 - 2 g atomes par mole d'enzyme, dosage de l'activité simple et très sensible, et stabilité excellente de l'aminopeptidase et de l'apoenzyme.

a) Le principe du dosage du zinc.

L'apoenzyme est ajoutée à l'échantillon dont on veut doser le zinc. L'apoenzyme inactive est alors réactivée proportionnellement à la quantité de zinc dans l'échantillon. L'activité résultante est mesurée sur une aliquote dans une solution de substrat contenant de l'EDTA, donc exempte de traces de métaux. A partir de l'augmentation de l'activité la concentration du zinc dans l'échantillon peut facilement être calculée. Pour éviter les interférences possibles il est préférable de se servir d'une courbe de calibration et/ou d'un étalon interne de zinc. Un contrôle additionnel consisté en une réactivation complète de l'apoenzyme, partiellement activée par l'échantillon à zinc, dans

une solution de substrat contenant du zinc en excès. Si l'activité ainsi trouvée est inférieure à l'activité obtenue par la réactivation de l'apoenzyme (en l'absence de l'échantillon) cela signifie que le dosage n'est pas valable, suite à l'inactivation partielle de l'enzyme.

b) Les droites de calibration pour le dosage du zinc.

Pour vérifier que notre méthode peut être appliquée même en présence de très faibles concentrations de zinc, deux droites de calibration ont été établies et leurs coefficients de régression calculés. La première droite (fig. 3) comprend les concentrations de zinc entre 5 et 50 pg/ml. L'écart type pour l'ensemble des points de cette droite est de 11%. La figure 4 représente une droite de calibration pour des concentrations allant de 25 à 250 pg Zn^{2+} /ml. L'écart type pour les points de cette droite est de 7%. Les déviations sont dues surtout aux contaminations métalliques. Le zinc peut naturellement aussi être dosé à des concentrations plus élevées.

c) Le dosage du zinc en présence d'un autre cation en excès.

L'interférence de 16 différents cations avec ce dosage de zinc a été soigneusement étudié. Pour ce faire, nous avons ajouté l'apoenzyme à une solution contenant 100 pg Zn^{2+} et une concentration d'un autre cation en excès molaire de 10 à 100 fois par rapport au zinc. La réactivation de l'apoenzyme a été mesurée comme auparavant sur une aliquote. Comme étalon interne, une quantité connue de zinc (111 pg/ml) a été ajoutée au reste de la solution. Sur la base de la réactivation obtenue avec l'étalon interne, la concentration originelle de zinc a été calculée. Le Tableau I montre les résultats d'une série de 3 dosages indépendants pour chaque cation. Pour que l'erreur relative ne dépasse pas 10%, il ne faut pas que l'excès de Cd^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} dépasse 25 x, et celui de Cu^{2+} et Co^{2+} 10 x. Dans le cas du Ni^{2+} , un excès de 10 x cause déjà une erreur de 30%.

Les ions de Cu^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} qui réactivent aussi l'apoaminopeptidase peuvent être dosés dans des concentrations de quelques ng/ml. Contrairement à l'aminopeptidase

contenant le zinc, la Cu-, Co- ou Ni-aminopeptidase se désactive rapidement au cours du dosage en présence d'EDTA. Grâce à ce phénomène, le zinc peut donc être dosé même en présence de ces trois cations.

IV. CONCLUSIONS.

- 1) L'aminopeptidase particulière satisfait aux critères généralement admis pour caractériser une métalloenzyme: la molécule d'aminopeptidase ne contient que deux atomes de zinc fortement liés à l'exclusion de tout autre métal. L'augmentation du rapport Zn^{2+} /protéine au cours de la purification montre que le zinc est une partie intrinsèque de l'enzyme. Au cours de l'élimination du zinc de l'aminopeptidase, l'activité enzymatique diminue parallèlement à la concentration de zinc. L'adjonction de zinc à l'aminopeptidase restaure entièrement et instantanément l'activité aminopeptidasique. Les agents complexant les métaux sont des inhibiteurs puissants de l'aminopeptidase.
- 2) Notre méthode enzymatique du dosage du zinc est la méthode la plus sensible décrite jusqu'à présent. Elle permet de déterminer des traces de zinc avec une bonne précision même en présence d'ions bivalents en excès, car un seul pg de Zn^{2+} suffit à réactiver entièrement 2 ng d'apoaminopeptidase - une quantité d'enzyme qu'il est encore possible de doser.

BIBLIOGRAPHIE.

- 1) Smith, E.L., in "The Enzymes", p.2, 2nd ed.
Edit. Boyer, P.B., Lardy, H. and Myrback, K.,
Academic Press New York and London (1960).
- 2) Wachsmuth, E.D., Fritze, I. and Pfeleiderer, G. (1966)
Biochemistry 5, 169-174.
- 3) Wacker, H., Lehky, P., Fischer, E.H. and Stein, E.A. (1971)
Helv. 54, 473.
- 4) Lehky, P., Lisowski, J., Wolf, D., Wacker, H. and Stein, E.A.
(1973) Biochim.Biophys.Acta 321, 274-281.
- 5) Wachsmuth, E.D. Fritze, I. and Pfeleiderer, G. (1966)
Biochemistry 5, 175-182.
- 6) Femfert, U. and Pfeleiderer, G. (1970) FEBS Letters 8, 65-67.
- 7) Pfeleiderer, G. and Femfert, U. (1969) FEBS Letters 4,
262-268.
- 8) Femfert, U. and Pfeleiderer, G. (1970) FEBS Letters 14, 89-91.
- 9) Hanson, H., Hütter, H.J., Mannsfeldt, H.G., Kretschmer, K.
and Sohr, Ch. (1967) Z.Physiol.Chem. 348, 680-688.
- 10) Stein, E.A., Hsiu, J. and Fischer, E.H. (1964)
Biochemistry 3, 55-66.

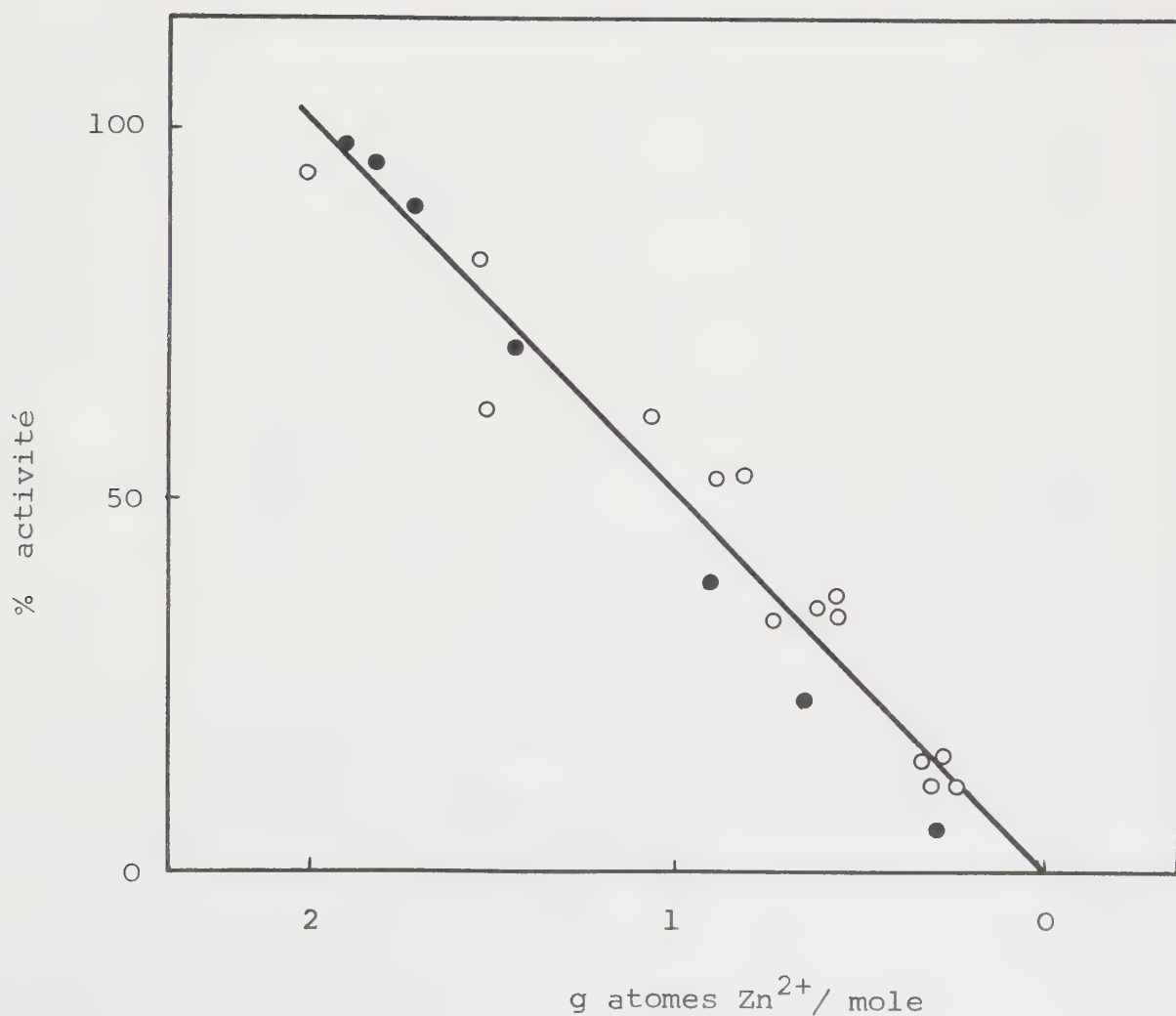
Tableau 1. Détermination du zinc en présence d'un cation en excès.

La concentration de zinc d'une solution contenant 100 pg de zinc par ml, et un autre cation en excès a été déterminée selon la méthode de l'étalon interne (voir le texte). Les résultats de trois dosages indépendants sont présentés.

Cation en excès molaire		Concentration trouvée	Cation en excès molaire		Concentration trouvée
NH_4^+	100x	100, 104, 96	Ni^{2+}	10x	123, 128, 132
Be^{2+}	100x	94, 94, 95	Cu^{2+}	10x	95, 101, 109
Mg^{2+}	100x	90, 109, 109	Sr^{2+}	100x	90, 107, 96
Al^{3+}	100x	101, 109, 93	Pd^{2+}	100x	107, 113, 108
Ca^{2+}	100x	97, 99, 90	Ag^+	100x	100, 106, 100
Sc^{3+}	100x	109, 98, 111	Cd^{2+}	25x	107, 89, 112
Cr^{3+}	100x	105, 99, 104	Ba^{2+}	100x	88, 102, 101
Mn^{2+}	100x	94, 98, 101	La^{3+}	100x	110, 103, 102
Fe^{2+}	25x	91, 91, 89	Hg^{2+}	25x	91, 106, 90
Co^{2+}	10x	101, 93, 109	Pb^{2+}	25x	97, 88, 93

Figure 1. Corrélation entre la teneur en zinc de l'aminopeptidase et son activité.

L'enzyme (2,1 uM) a été incubée à 25° dans 50 mM TES à pH 7,0 avec le Chelex (o) ou 0,1 mM EDTA (●). Avant l'analyse, l'EDTA a été séparé de l'enzyme par chromatographie sur Sephadex G-25; le Chelex a été éliminé par centrifugation.



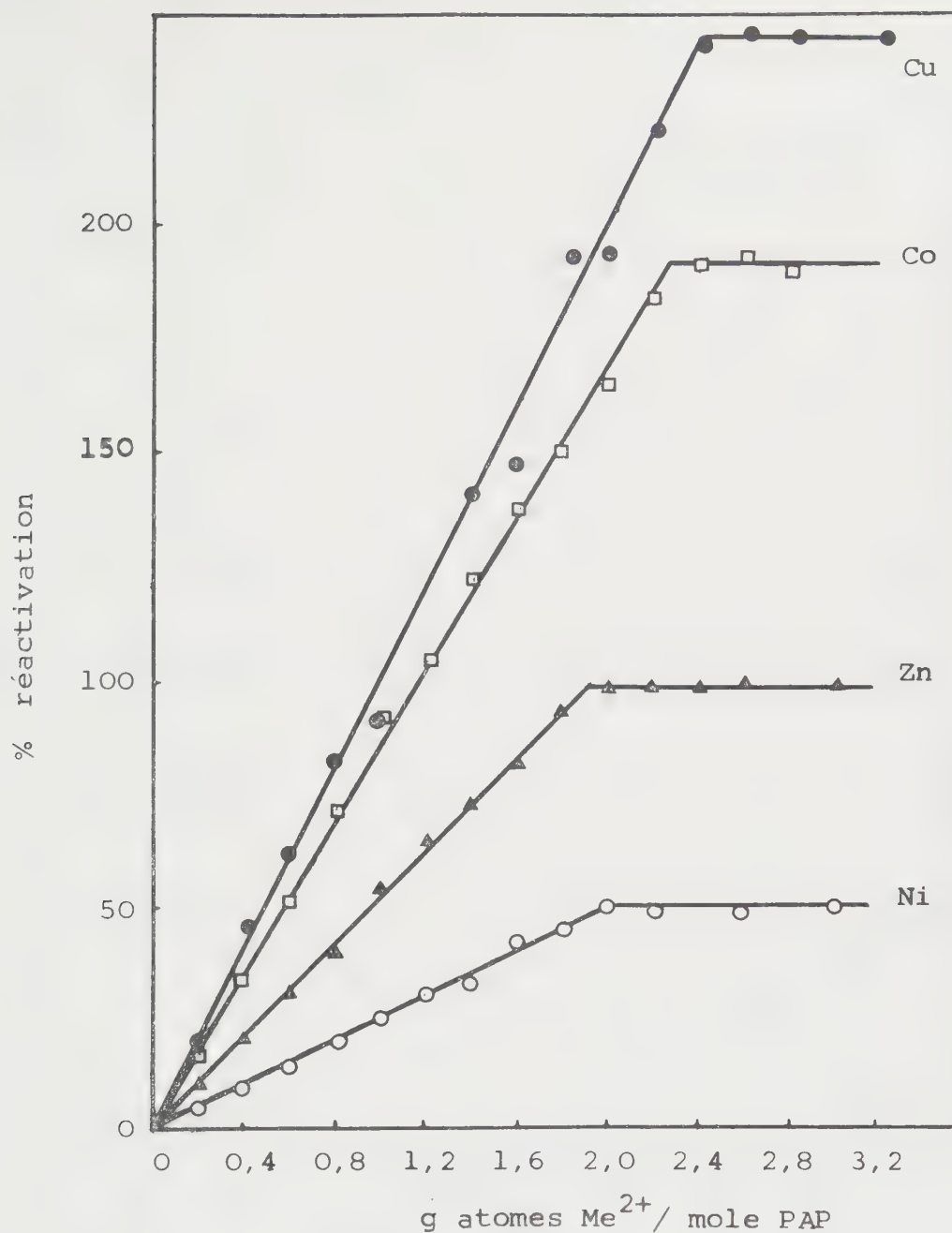


Figure 2. Titration de l'apoaminopeptidase par Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Ni^{2+} .

Deux mg d'apoaminopeptidase dans 4 ml TES (50 mM, pH 7,0) ont été titrés par différents cations. L'activité a été déterminée en présence d'EDTA 5 minutes après chaque addition du métal.

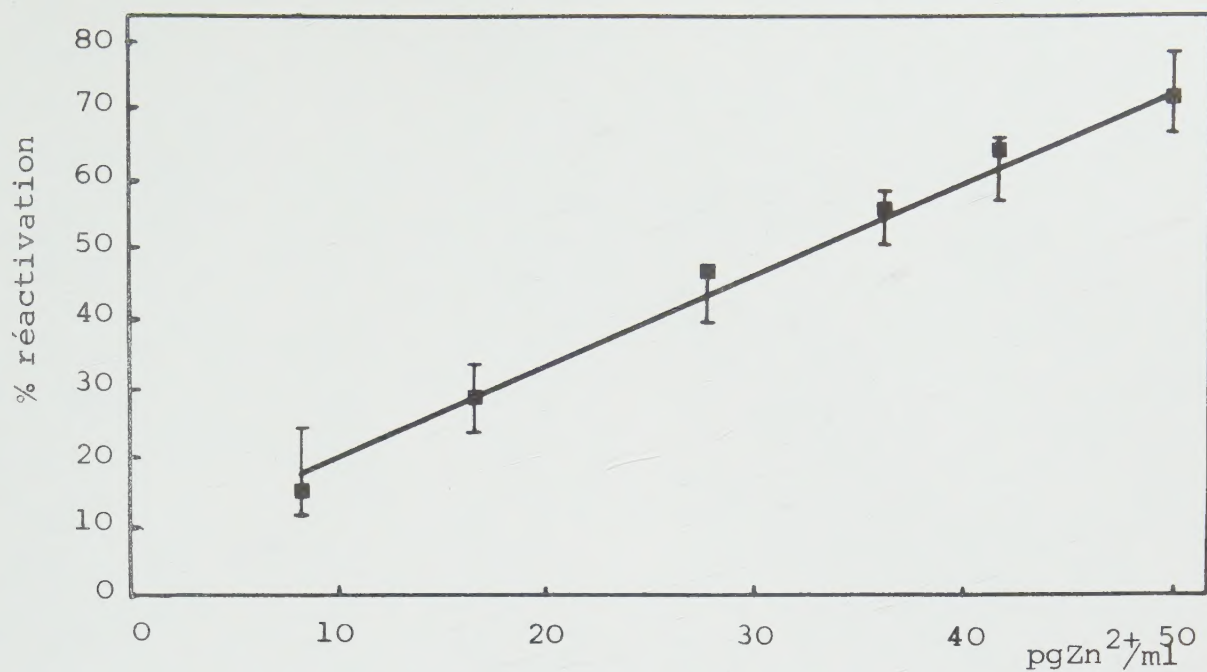


Figure 3. Droite de calibration pour le dosage du zinc.

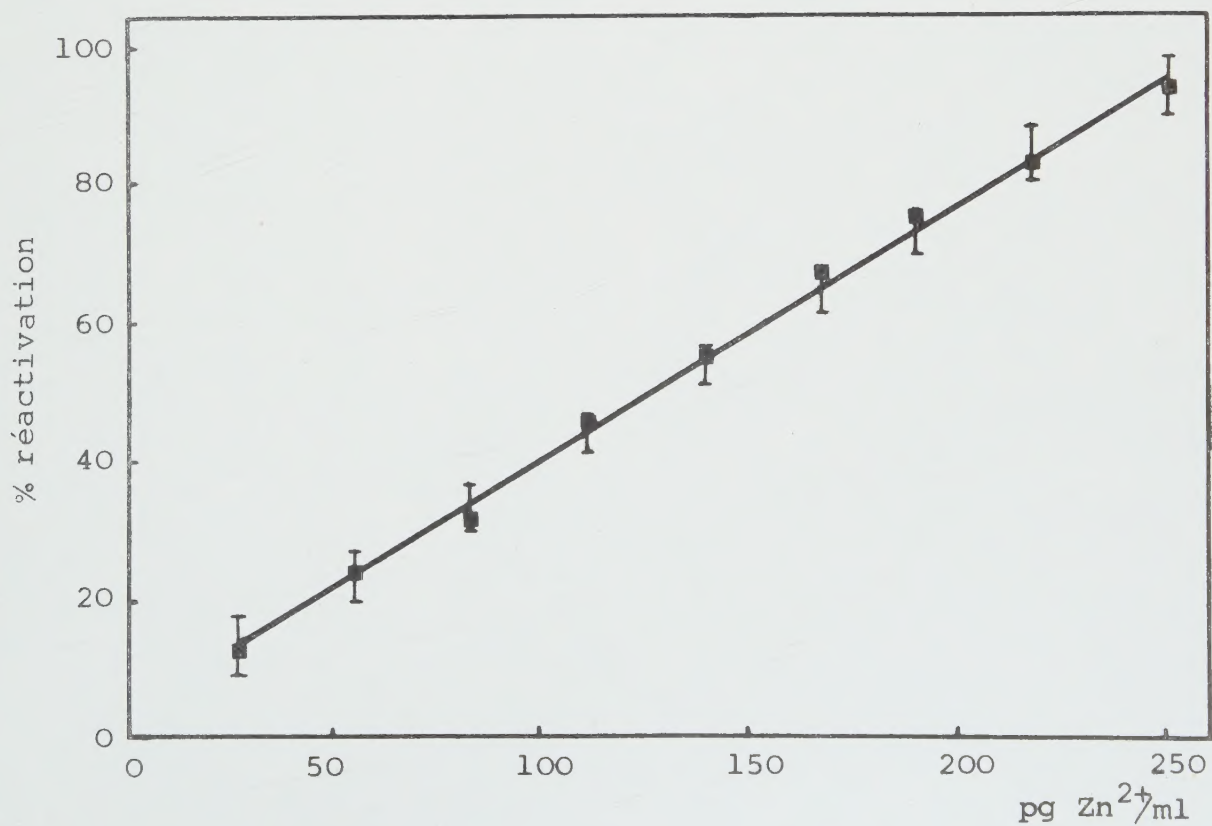


Figure 4 . Droite de calibration pour le dosage du zinc.

